

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'ASSOCIATION
ENTRE LA CASEINE κ ET LA CASEINE α_s A pH NEUTRE

SUMMARY

Contribution to the study of the association between κ - and α_s -caseins at neutral pH

During rennin action on a mixture of α_s - and κ -caseins we have observed:

1. A decrease in the release of protons measured by the potentiometric method at pH 6.9.
2. An inhibition of the fibrillar formation of para- κ -casein.

This can be explained by a reversible association between α_s -casein and κ -casein with a molar ratio 1:1 on a site close to the ester bond split off by rennin but different from the site of fixation of the enzyme on κ -casein.

After this association has occurred the carboxyl group of the ester bond split off by rennin is no longer titrable at pH 7, possibly due to an allosteric effect. This carboxyl group may play a role in the association into fibrils of para- κ -casein alone.

The rate of formation of the κ - α_s -caseins complex is very high, higher than the rate of formation of the enzyme-substrate complex. At 35°, the dissociation constant of α_s -casein with κ -casein is: 0.75 ± 0.15 g/l or $2.8 \pm 0.6 \cdot 10^{-5}$ M on a molecular basis. The constant is small and of the same order of magnitude as that of rennin with κ -casein.

The heat of formation of the κ - α_s -caseins complex is equal to zero and the whole variation of standard free energy of the reaction, $\Delta F_{35^\circ} = -6350 \pm 150$ cal/mole, is linked to a positive variation of entropy $\Delta S_{35^\circ} = +21 \pm 0.5$ cal/degree per mole.

INTRODUCTION

La forme micellaire que possèdent les caséines dans le lait suggère, en elle-même, l'existence de toute une gamme d'associations entre chacun des divers constituants.

Par ailleurs les anomalies électrophorétiques observées par WARNER¹ puis par NITSCHMAN *et al.*² ont conduit à envisager également la formation de complexes entre les caséines en solution neutre et en présence uniquement d'ions monovalents. A la suite de divers travaux, en particulier ceux de BURK *et al.*³ et de SULLIVAN *et al.*⁴

* La majeure partie de ce travail a été présentée dans une thèse de Doctorat soutenue en juin 1962 à la Faculté des Sciences de Paris.

ASSOCIATION ENTRE LA CASEINE κ ET LA CASEINE α_s

Méthode de précipitation trichloracétique

Nous avons dosé par microKjeldahl l'azote soluble dans le filtrat trichloracétique à 2 ou 12 % de concentration finale en acide trichloracétique¹².

Ultracentrifugations

Elles ont été faites dans une ultracentrifugeuse analytique Spinco modèle E, et dans des conditions telles que la vitesse initiale apparente d'hydrolyse est réduite à 30 % environ de la vitesse initiale observée en l'absence de caséine α_s . Nous avons utilisé pour les deux caséines le même volume partiel spécifique moyen 0.728 (réf. 13).

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Mise en évidence d'une association caséine κ -caséine α_s

Nous avons suivi, par différentes méthodes, la réaction enzymatique en présence de caséine α_s afin de préciser si cette réaction est inhibée ou non.

D'autre part, en examinant par ultracentrifugation un mélange de caséine κ et de caséine α_s , nous avons cherché une preuve directe de leur association dans nos conditions expérimentales.

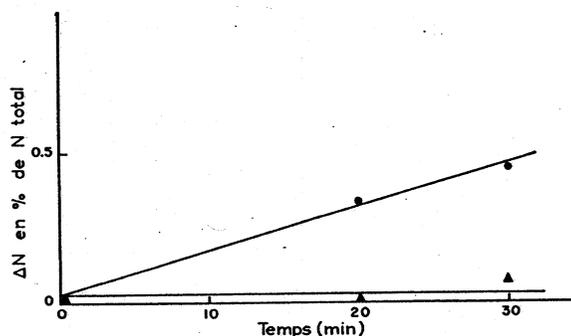


Fig. 1. Action de la présure sur la caséine α_s suivie par la méthode trichloracétique. ●—●, azote soluble dans l'acide trichloracétique à 2 %; ▲—▲, azote soluble dans l'acide trichloracétique à 12 % (caséino-glycopeptide). En abscisses: temps d'action de la présure en minutes. En ordonnées: augmentation de l'azote soluble dans l'acide trichloracétique en pourcent de l'azote total, blanc déduit (0.37 % à 2 % d'acide trichloracétique et 0.33 % à 12 % d'acide trichloracétique). Concentration en caséine α_s : $s = 8.5$ mg/ml. Concentration en présure: $e = 0.108$ U.P./ml. Température, 35°; pH, 6.95; NaCl, 0.1 M.

Etude au pH-stat et comparaison avec la méthode de précipitation trichloracétique

Action de la présure sur la caséine α_s seule: Elle a été suivie à la fois par la mesure des protons libérés à pH 6.95 au pH-stat et par la méthode de précipitation trichloracétique. Aucune libération de protons, ni d'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 12 % n'a été observée. On a seulement pu mettre en évidence une très faible activité de la présure par détermination de l'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 2 % (Fig. 1).

Action de la présure sur un mélange de caséine α_s et de caséine κ : L'action inhibitrice de la caséine α_s sur la précipitation de la caséine κ par la présure va de pair avec une diminution du nombre de protons libérés (Fig. 2), comme si cette réaction elle aussi était inhibée. Cette diminution est indépendante du temps de contact (1 min à 1 h) entre les deux caséines ou entre la caséine α_s et la présure.

l'urée a souvent été utilisée pour dissocier ces complexes. Dans la mesure où l'on attribue à l'urée la propriété de rompre un certain nombre de liaisons secondaires (forces de Van der Waals, liaisons hydrogène), on peut penser que celles-ci jouent un rôle important dans la stabilité des complexes.

Au cours de l'action de la présure les solutions de caséine κ à pH neutre, en absence d'ions divalents, se troublent, précipitent (5 et 6), ou même forment un gel à condition que la concentration soit suffisante (environ 1 %). Après quelque temps ce gel se rétracte et, au cours d'une sorte de synérèse, il se forme des fibrilles. Or une solution sodique de caséine entière, qui contient par conséquent la caséine κ , reste parfaitement limpide et liquide au cours de l'action de la présure.

Pour tenter d'expliquer une telle différence de comportement, nous avons ajouté de la caséine α_s à une solution de caséine κ et observé que cette addition avait pour conséquence de retarder et même d'empêcher la précipitation fibrillaire de la caséine κ par la présure⁷. Plus récemment, nous avons observé que l'addition de caséine β et même de caséine entière, étaient capables de produire le même phénomène (résultats non publiés).

Le présent travail a pour but d'étudier le mécanisme d'action de la caséine α_s . Son association éventuelle avec la caséine κ peut en effet soit inhiber l'action de la présure soit maintenir en solution la caséine κ après hydrolyse par cet enzyme.

Cette association ne constitue cependant qu'une première étape vers la reconstitution de la micelle de caséine puisqu'il faut y introduire les autres caséines, en particulier la caséine β et les sels minéraux et, parmi ces derniers, le calcium.

MATERIEL ET METHODES

Caséine κ

Elle a été préparée selon la méthode de MCKENZIE ET WAKE⁸.

Caséine α_s

Nous avons employé la technique de WAUGH *et al.*⁹ à partir d'un lait de mélange et utilisé la préparation obtenue soit telle quelle, soit après purification par chromatographie sur DEAE-cellulose¹⁰. Nous n'avons pas observé de différences supérieures aux erreurs expérimentales entre les capacités d'association de ces deux types de préparations avec la caséine κ .

Présure cristallisée

Nous avons utilisé la présure cristallisée Hansen fournie par B. FOLTMANN. La concentration en présure du mélange réactionnel a été exprimée en unités présure (U.P.) selon BERRIDGE^{11, 12} μg de cette présure cristallisée correspondant à 1 U.P.

Méthode potentiométrique à pH constant

Nous avons utilisé la méthode décrite précédemment¹². Les mesures ont été effectuées en milieu de force ionique constante (NaCl 0.1 M). Nous avons procédé habituellement à l'addition de caséine α_s en dissolvant un certain poids de cette caséine lyophilisée dans une solution de caséine κ en NaCl 0.1 M (pH \sim 6.4). Après dissolution complète de la caséine α_s , le pH du mélange était ensuite ajusté et la présure ajoutée dans des conditions identiques à celles déjà décrites¹².

ASSOCIATION ENTRE LA CASEINE κ ET LA CASEINE α_s

Examen par ultracentrifugation du mélange caséine κ et caséine α_s

Nous avons répété les essais de WAUGH *et al.*⁵ en utilisant nos propres préparations de caséine κ et de caséine α_s . Nous avons représenté, sur la Fig. 4, les diagrammes d'ultracentrifugation des caséines κ et α_s seules et en mélange. Le diagramme correspondant au mélange n'est pas simple à interpréter; toutefois il indique manifestement selon la théorie de GILBERT ET JENKINS¹⁴ une association entre ces deux constituants de la caséine dans nos conditions expérimentales puisqu'on ne retrouve pas les pics correspondants à chacun des constituants mais que l'on observe un pic dont le coefficient de sédimentation, $s_{20,w} = 14.7$ S, est intermédiaire entre celui de la caséine κ ($s_{20,w} = 16.9$ S) et celui de la caséine α_s ($s_{20,w} = 5.6$ S). Ce pic groupe la majeure partie du matériel centrifugé.

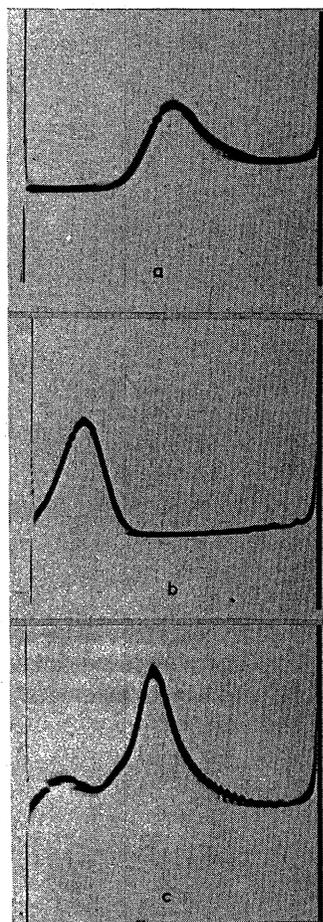


Fig. 4. Diagrammes d'ultracentrifugation des caséines κ et α_s et de leur mélange. (a) Caséine κ (3.8 mg/ml). Photo prise au bout de 60 min (angle 45°). (b) Caséine α_s (3.2 mg/ml). Photo prise au bout de 64 min (angle 55°). (c) Mélange caséine κ -caséine α_s . Photo prise au bout de 60 min (angle 45°). Caséine κ , 3.8 mg/ml; caséine α_s , 3.2 mg/ml. Vitesse, 39 460 tours/min; température, 25.5° sauf pour (b) (25.05°); NaCl, 0.1 M; pH 6.95.

Par contre la libération de l'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 12 % (ou caséino-glycopeptide) n'est pas modifiée par la présence de la caséine α_s (Fig. 3). Elle n'est pas modifiée non plus lorsqu'on ajoute à la caséine κ la caséine entière, au lieu de la caséine α_s .

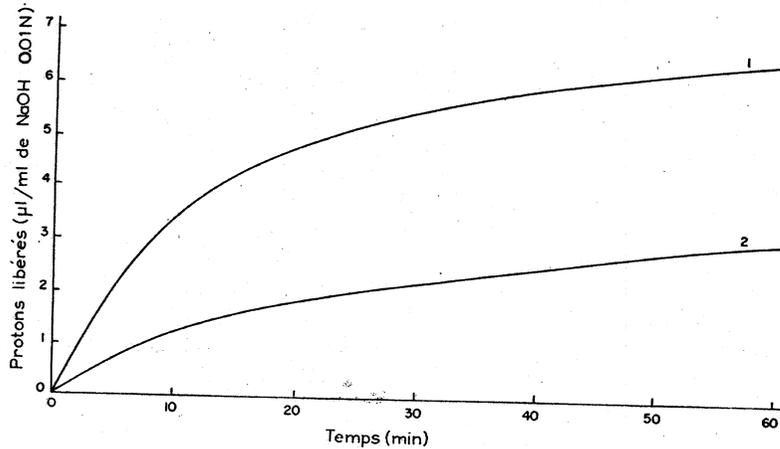


Fig. 2. Comparaison entre la libération de protons à partir de la caséine κ seule et de la caséine κ additionnée de caséine α_s . Courbe 1, caséine κ seule (4.7 mg/ml); Courbe 2, caséine κ (4.7 mg/ml), caséine α_s (4 mg/ml). Concentration en présure: $8.5 \cdot 10^{-3}$ U.P./ml (0.1 µg/ml). Température, 40.2°; pH, 6.95; NaCl, 0.1 M. En abscisses: temps écoulé depuis l'addition de la présure en minutes. En ordonnées: protons libérés en µl de NaOH 0.01 N par ml d'hydrolysats (1 µl de NaOH 0.01 N = 10^{-8} H⁺).

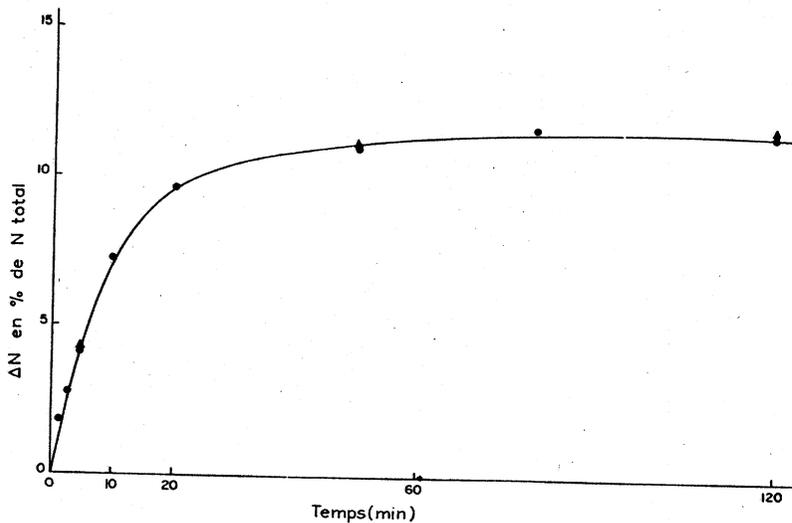


Fig. 3. Comparaison entre la libération du caséino-glycopeptide à partir de la caséine κ seule et de la caséine κ additionnée de caséine α_s . ●—●, caséine κ seule (5 mg/ml); ▲—▲, caséine κ (5 mg/ml) et caséine α_s (4 mg/ml). Concentration en présure: $8.5 \cdot 10^{-3}$ U.P./ml (0.1 µg/ml). Température, 40.2°; pH, 6.95; NaCl, 0.1 M. En abscisses: temps écoulé depuis l'addition de présure en minutes. En ordonnées: augmentation de l'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 12%, déduction faite de l'azote soluble au temps zéro (0.55% N.T.) et exprimé en pourcent de l'azote de la caséine κ .

ASSOCIATION ENTRE LA CASEINE κ ET LA CASEINE α_s

on peut penser que les protons libérés ne proviennent que de la caséine κ non combinée à la caséine α_s lorsque la concentration de cette dernière n'est pas suffisante pour saturer toute la caséine κ .

Il s'ensuit que le rapport $a = v_{\alpha_s}/v$, où v représente la vitesse de la réaction en absence de caséine α_s et v_{α_s} la vitesse apparente en présence de caséine α_s , est tel que :

$$\frac{v_{\alpha_s}}{v} = \frac{\text{caséine } \kappa \text{ libre}}{\text{caséine } \kappa \text{ totale}} = \frac{(S)}{s} \quad (4)$$

s représentant la concentration totale en caséine κ .

Calcul de v_{α_s} dans le cas général: L'équilibre \mathbf{I} étant réalisé, d'après les Eqns. 2 et 4 nous avons :

$$\frac{v_{\alpha_s}}{v} = a = \frac{\mathbf{I}}{\mathbf{I} + \frac{(\alpha_s)^n}{K_{\alpha_s}}} \quad (5)$$

Comme l'inhibition ne porte pas sur la réaction enzymatique elle-même, d'après les Eqns. 3 et 3' l'expression de la vitesse d'hydrolyse est de la forme :

$$v = \frac{k_s es}{K_m + s} \quad \text{avec } K_m = \frac{k'_1 + k_s}{k_1} \quad (6)$$

Ceci suppose que l'état stationnaire est réalisé et que l'on peut négliger devant s la concentration de caséine κ combinée sous forme de complexe ES ou $ES(\alpha_s)_n$, ce qui est toujours le cas puisque la concentration en présure, e , est très petite.

Par suite, d'après les Eqns. 5 et 6

$$v_{\alpha_s} = \frac{k_s es}{K_m + s} \times \frac{\mathbf{I}}{\mathbf{I} + \frac{(\alpha_s)^n}{K_{\alpha_s}}} \quad \text{ou } v_{\alpha_s} = \frac{k_s e}{\mathbf{I} + \frac{(\alpha_s)^n}{K_{\alpha_s}}} \times \frac{s}{K_m + s} \quad (7)$$

Cas particuliers: Dans les applications expérimentales nous considérerons seulement les vitesses initiales apparentes $v_{0\alpha_s}$ mesurées pour les concentrations s_0 de caséine κ . Si $(\alpha_s)^n$ est très petit devant K_{α_s} on n'observe plus d'inhibition apparente. Cela se réalise d'autant plus vite que n est plus grand, puisque (α_s) est inférieur à l'unité, c'est-à-dire quand une molécule de caséine κ peut fixer plusieurs molécules de caséine α_s . On observe alors l'inhibition apparente seulement pour les faibles concentrations en caséine κ .

Si (α_s) peut être assimilée à la concentration totale en caséine α_s , c'est-à-dire si cette dernière est très grande devant s , l'inhibition est du type apparemment non compétitif lorsque s varie.

Enfin si (α_s) est du même ordre que s , quand s augmente d'après l'équilibre \mathbf{I} la quantité $\mathbf{I} + (\alpha_s)^n/K_{\alpha_s}$ décroît et tend vers \mathbf{I} . Pour des concentrations suffisamment élevées en caséine κ , il n'y aura plus d'inhibition apparente comme si l'inhibition était compétitive. De plus la variation de $v_{0\alpha_s}$ en fonction du rapport $v_{0\alpha_s}/s_0$ n'est plus linéaire. En fait il s'agit d'une inhibition que nous pourrions appeler pseudo-compétitive.

ASSOCIATION ENTRE LA CASEINE κ ET LA CASEINE α_s

d'après l'Eqn. 4 et l'expression de la vitesse v (Eqn. 6) appliquées aux conditions initiales.

Nous avons représenté, dans le Tableau I, la concentration en caséine κ libre, (S_0), calculée en utilisant les valeurs de K_m et k_s publiées antérieurement¹⁶. On en déduit par différence la concentration de la caséine κ sous forme de complexe $S_0(\alpha_s)_n$. Les études faites par WAUGH⁶ sur les réactions entre les caséines κ et α_s avaient conduit cet auteur à considérer que 3 molécules de caséine α_s se combinaient à une molécule de caséine κ . Cependant nos résultats expérimentaux ne sont pas compatibles avec une telle formule et s'accordent mieux avec l'hypothèse d'un rapport molaire égal à un. En effet, une fois toute la caséine α_s fixée sur la caséine κ , toute caséine κ ajoutée ensuite au mélange reste libre et donne lieu à une libération normale de protons. Si nous supposons que deux molécules de caséine α_s (et *a fortiori* 3) se combinaient à une unité cinétique de caséine κ , il faudrait très peu de caséine κ pour fixer toute la caséine

TABLEAU I
CONSTANTE DE DISSOCIATION CASÉINE κ -CASÉINE α_s À 40°
Concentration en caséine α_s totale 1.8 g/l.

| $v_{0\alpha_s}$ $10^{-3}H^+/min/ml$ | Caséine κ totale S_0 (g/l) | Caséine κ libre (S_0) (g/l) | Caséine α_s combinée (g/l) | | Caséine α_s libre (α_s) (g/l) | | $K_{\alpha_s} = \frac{(S_0)(\alpha_s)}{(S_0\alpha_s)}$ | |
|--|--|---|---|-------|--|--------|--|-------------|
| | | | $n=1$ | $n=2$ | $n=1$ | $n=2$ | (g/l) | $10^{-5} M$ |
| 0.66 | 1.26 | 0.29 | 0.48 | 0.96 | 1.32 | 0.84 | 0.82 ± 0.05 | 1.5 ± 0.1 |
| 0.93 | 1.87 | 0.52 | 0.66 | 1.32 | 1.14 | 0.48 | 0.88 ± 0.05 | 1.6 ± 0.1 |
| 0.85 | 2.54 | 0.57 | 0.97 | 1.94 | 0.83 | < 0.01 | 0.44 ± 0.1 | 0.8 ± 0.2 |
| 1.32 | 3.91 | 1.15 | 1.36 | 2.72 | 0.44 | < 0.01 | 0.37 ± 0.16 | 0.7 ± 0.3 |
| 3.05 | 4.9 | 3.16 | 0.86 | 1.72 | 0.94 | 0.08 | 3.1 ± 1.1 | 5.6 ± 2 |
| 3.99 | 9.36 | 6.7 | 1.30 | 2.60 | 0.50 | < 0.01 | 2.5 ± 1.7 | 4.5 ± 3 |
| 3.81 | 9.36 | 6.6 | 1.35 | 2.70 | 0.45 | < 0.01 | 2.1 ± 1.7 | 3.8 ± 3 |

α_s , c'est-à-dire pour que l'inhibition apparente ne soit plus observée. Tel n'est pas le cas (cf. Tableau I pour $n=2$ et Fig. 5 lorsque $\alpha_s = 1.8$ g/l). Nous avons calculé la concentration en caséine α_s libre en grammes/litre en tenant compte des poids moléculaires respectifs de 55 000 et 27 000 pour la caséine κ et la caséine α_s ^{12, 15}.

D'après l'Eqn. 7, si l'on étudie la variation de la vitesse initiale apparente, $v_{0\alpha_s}$, en fonction du logarithme décimal de l'inverse de la concentration en caséine α_s libre, on doit obtenir une courbe en S, courbe classique de la relation "dose effet". Tel est bien le résultat indiqué dans la Fig. 7, où l'abscisse du point d'inflexion pour $v_{0\alpha_s}/v_0 = 0.5$, représente la valeur de la constante de dissociation du complexe caséine κ -caséine α_s soit $K_{\alpha_s} = 0.75 \pm 0.15$ g/l à 35° puisque $n=1$.

Influence du pH

Alors que l'influence du pH sur la protéolyse de la caséine κ seule est facilement interprétable¹², il n'en est plus de même lorsque la caséine α_s est ajoutée à la caséine κ (Fig. 6). Nous avons déjà éprouvé une difficulté analogue avec la caséine entière¹². Sans prétendre éclaircir le comportement de la caséine entière, mélange très complexe¹⁷, l'effet de la seule addition de caséine α_s à la caséine κ nous semble déjà lui-

Influence de la concentration en caséine κ

Nous avons représenté, dans la Fig. 5, un exemple de variation de la vitesse initiale apparente $v_{0\alpha_s}$ en fonction de v_0/s_0 , selon la représentation d'EADIE. Nous avons aussi indiqué les résultats obtenus avec la caséine κ seule, dans les mêmes conditions. L'inhibition apparente observée est d'autant plus faible que la concentration en caséine κ est plus grande, c'est-à-dire présente un caractère compétitif, et les points expérimentaux ne sont pas répartis sur une droite qui couperait l'axe des ordonnées au point de vitesse maximum obtenue lors de l'hydrolyse de la caséine κ seule. Cela se produit quand la concentration en inhibiteur libre, la caséine α_s , est du même ordre que celle de son substrat (cf. ci-dessus). Seule la caséine κ est en concentration suffisante pour remplir cette condition car les concentrations en présure sont toujours très faibles. Ce résultat est un élément supplémentaire en faveur d'une association entre la caséine α_s et la caséine κ .

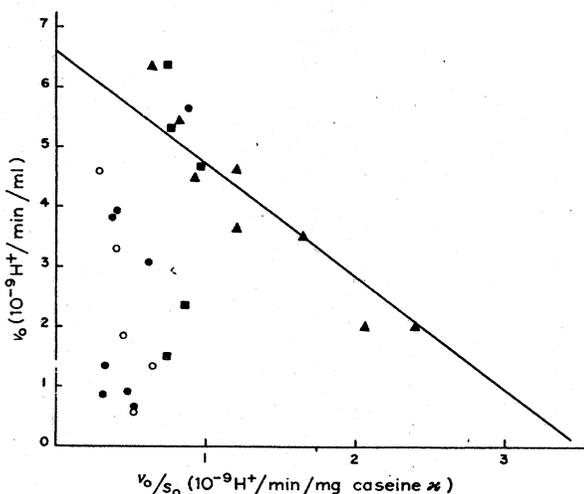


Fig. 5. Etude de l'inhibition due à la présence de caséine α_s en fonction de la concentration en caséine κ et pour une concentration en présure de $8.2 \cdot 10^{-3}$ U.P./ml. \blacktriangle , sans ajouter de caséine α_s ; \blacksquare , concentration en caséine α_s (0.9 mg/ml); \bullet , concentration en caséine α_s (1.8 mg/ml); \circ , points calculés, concentration en caséine α_s , 2 mg/ml. Température, 40.3° ; pH, 6.95; NaCl, 0.1 M. En abscisses: rapport entre la vitesse initiale v_0 et la concentration initiale s_0 de caséine κ , exprimé en H^+ /min/mg de caséine κ . En ordonnées: vitesse initiale, exprimée en H^+ /min/ml.

Influence de la concentration en caséine α_s

Les concentrations en caséine α_s étant du même ordre de grandeur que celles de la caséine κ , la caséine α_s combinée à la caséine κ ne peut être négligée et la concentration en caséine α_s libre doit être calculée. Pour connaître, d'après nos résultats cinétiques, la concentration en caséine α_s libre, il faut calculer la concentration en complexe $\alpha_s-\kappa$ et établir sa formule.

La concentration du complexe $\alpha_s-\kappa$, $(S_0(\alpha_s)_n)$, se calcule facilement en observant que $s_0 = (S_0) + (S_0(\alpha_s)_n)$ et que la valeur de (S_0) est donnée par la valeur de la vitesse initiale apparente observée en présence de caséine α_s :

$$(S_0) = v_{0\alpha_s} \frac{(K_m + s_0)}{k_s e}$$

où nous nous sommes placés: à pH 7.6 il n'y aurait plus de caséine κ non combinée à la caséine α_s .

Influence de la température

La constante de dissociation du complexe caséine κ -caséine α_s a été mesurée à 25, 30, 35 et 40° en portant la vitesse initiale apparente en fonction du logarithme décimal de la concentration en caséine α_s libre (Fig. 7). Pour chaque concentration en caséine α_s totale, la concentration en caséine α_s libre a été calculée comme il est décrit ci-dessus en utilisant les valeurs de K_m et de k_s antérieurement déterminées à différentes températures¹⁶.

Dans les limites des erreurs expérimentales, K_{α_s} ne varie pas entre 25 et 40°, nous avons trouvé que $-\log K_{\alpha_s}$ était toujours compris entre 0.06 et 0.16 soit $0.7 < K_{\alpha_s} < 0.9$ g/l. La chaleur de formation du complexe ou enthalpie, ΔH , est donc nulle.

CONCLUSION

L'étude par potentiométrie à pH constant de l'action de la présure sur un mélange de caséine κ et α_s nous a permis de mettre en évidence une association entre ces deux caséines, association dont l'existence et l'ordre de grandeur ont été confirmés par ultracentrifugation.

Connaissant k_s et K_m ¹⁶ ainsi que K_{α_s} et e , nous avons donné dans la Fig. 5 un exemple des valeurs calculées de la vitesse initiale apparente $v_{0\alpha_s}$ pour $n = 1$ et une concentration en caséine α_s totale de 2 mg/ml d'après les Eqns. 2 et 7. Nous avons pris comme valeur de la concentration en caséine α_s libre la racine positive de l'équation du second degré en (α_s) tirée de l'Eqn. 2.

Les valeurs ainsi calculées coïncident remarquablement bien avec les valeurs expérimentales alors que, pour écrire l'Eqn. 1, nous avons introduit l'hypothèse simplificatrice d'une réaction entre monomères de caséines κ et α_s bien que celles-ci soient fortement polymérisées dans nos conditions expérimentales ($s_{20, w} = 16.9$ S et $s_{20, w} = 5.6$ S respectivement). Cette concordance inattendue, étant donné la complexité supposée *a priori* des systèmes réagissants, nous semble devoir s'expliquer si le processus de polymérisation est négligeable devant le processus prépondérant d'aggrégation molécules à molécules entre les caséines κ et α_s . Ceci est d'autant plus vraisemblable que des expériences récentes indiquent une variation avec la température du degré de polymérisation de la caséine α_s alors que la constante de dissociation du complexe K_{α_s} reste invariable. Il est alors possible d'exprimer la constante de dissociation K_{α_s} en mole/l en donnant à la caséine κ un poids moléculaire de 55 000. Nous avons choisi ce dernier chiffre (a) parce qu'il correspond à l'unité cinétique déterminée antérieurement par la même méthode potentiométrique^{12, 16} et (b) parce que la pureté de la caséine κ n'est pas encore suffisamment définie pour imposer une autre valeur. Dans ces conditions, nous obtenons $K_{\alpha_s} = 2.8 \pm 0.6 \cdot 10^{-5}$ M ou pour la constante d'association $1/K_{\alpha_s} = 3.5 \pm 0.7 \cdot 10^4$ M⁻¹.

L'affinité des deux protéines entre elles est donc grande et analogue à celle de la présure pour la caséine κ ($3 \cdot 10^4$ M⁻¹ (voir réf. 16)). La formation du complexe caséine κ -caséine α_s est très rapide, plus rapide même que celle de la formation du complexe

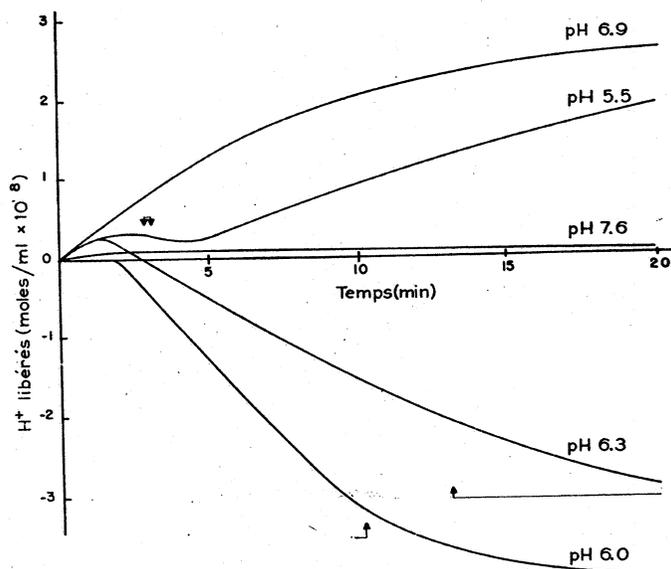


Fig. 6. Influence du pH sur le nombre de protons libérés à partir de la caséine κ additionnée de caséine α_s . Concentration en caséine κ , 4 mg/ml; concentration en caséine α_s , 2 mg/ml; concentration en présure, $10 \cdot 10^{-3}$ U.P./ml ($0.12 \mu\text{g/ml}$); température, 35.3° . En abscisses: temps écoulé depuis l'addition de la présure. En ordonnées: mole de H^+ ou de OH^- libérés par ml d'hydrolysats. \downarrow , début ou fin de précipitation.

même difficile à expliquer de façon satisfaisante. Nous pouvons remarquer que, dans les conditions expérimentales de la Fig. 6, si la précipitation de la caséine κ n'a plus lieu à pH 7.6, elle se produit néanmoins au bout de 4 h à pH 6.9 et au bout d'un temps plus court pour des pH plus bas. On peut alors penser que l'association de la caséine α_s avec la caséine κ doit être fortement dépendante du pH dans les conditions

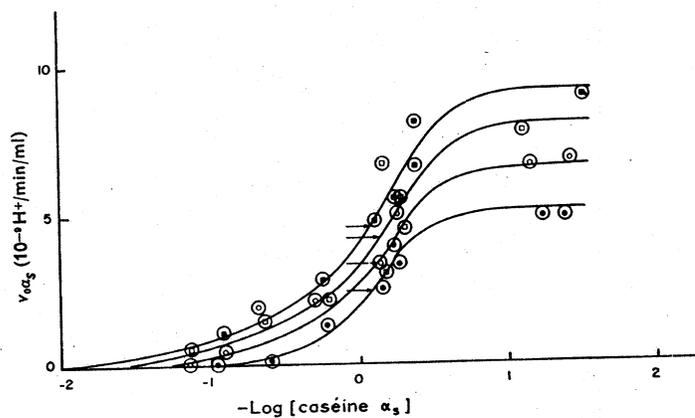


Fig. 7. Variation de la vitesse initiale en fonction du logarithme de l'inverse de la concentration en caséine α_s libre à différentes températures. Concentration en présure, $14 \cdot 10^{-3}$ U.P./ml; concentration en caséine κ (4 mg/ml) à \bullet , 25° ; \circ , 30.3° ; \square , 35.1° ; \blacksquare , 40.3° . En abscisses: logarithme décimal de l'inverse de la concentration de caséine α_s libre exprimée en g/l. En ordonnées: vitesse initiale exprimée en H^+ /min/ml.

ASSOCIATION ENTRE LA CASEINE κ ET LA CASEINE α_s

pH 7 du groupe carboxylique apparaissant après rupture de la liaison ester (ceci pourrait être un effet d'allostérie). Ce groupe doit jouer un rôle dans l'association en fibrilles des molécules de paracaseine κ .

La formation du complexe caséine α_s -caséine κ est très rapide, plus rapide que la formation du complexe enzyme-substrat. A 35° la constante de dissociation entre la caséine α_s et la caséine κ est 0.75 ± 0.15 g/l ou $2.8 \pm 0.6 \cdot 10^{-5}$ M, elle est petite et du même ordre que celle entre la présure et la caséine κ .

La chaleur de formation du complexe caséine κ -caséine α_s est nulle et toute la variation d'énergie libre standard de la réaction, $\Delta F_{35^\circ} = -6350 \pm 150$ cal/mole, est liée à une variation positive d'entropie $\Delta S_{35^\circ} = +21 \pm 0.5$ cal/degré/mole.

REMERCIEMENTS

Nous sommes heureux de remercier M. le Professeur TONNELAT pour l'intérêt qu'il a témoigné à ce travail, ainsi que le Dr. B. FOLTMANN qui nous a fournie la présure cristallisée.

Ce travail a bénéficié d'une subvention du Ministère de l'Agriculture des Etats-Unis (FG-Fr 103-61).

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ R. C. WARNER, *J. Am. Chem. Soc.*, 66 (1944) 1725.
- ² HS. NITSCHMANN ET H. ZÜRCHER, *Helv. Chim. Acta*, 33 (1950) 1698.
- ³ N. F. BURK ET D. M. GREENBERG, *J. Biol. Chem.*, 87 (1930) 197.
- ⁴ R. A. SULLIVAN, M. M. FITZPATRICK, E. K. STANTON, R. ANNINO, G. KISSEL ET F. PALERMITI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 55 (1955) 455.
- ⁵ D. F. WAUGH ET P. H. VON HIPPEL, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 4576.
- ⁶ D. F. WAUGH, *Discussions Faraday Soc.*, 25 (1958) 186.
- ⁷ J. GARNIER, G. MOCQUOT ET G. BRIGNON, *Compt. Rend.*, 254 (1962) 372.
- ⁸ H. A. MCKENZIE ET R. G. WAKE, *Biochim. Biophys. Acta*, 47 (1961) 240.
- ⁹ D. F. WAUGH, M. LUDWIG, J. M. GILLESPIE, J. GARNIER, E. S. KLEINER ET R. W. NOBLE, *Federation Proc.*, 19 (1960) 337.
- ¹⁰ J. GARNIER, B. RIBADEAU DUMAS ET J. GAUTREAU, *16ème Congr. Intern. Laiterie*, Vol. B, 1962, p. 655.
- ¹¹ N. J. BERRIDGE, *Biochem. J.*, 39 (1945) 179.
- ¹² J. GARNIER, *Ann. Biol. Animale Biochim. Biophys.*, 3 (1963) 71.
- ¹³ T. L. McMEEKIN, M. L. GROVES ET N. J. HIPP, *J. Am. Chem. Soc.*, 71 (1949) 3298.
- ¹⁴ G. A. GILBERT ET R. C. LI. JENKINS, *Nature*, 177 (1956) 853.
- ¹⁵ P. DREIZEN, R. W. NOBLE ET D. F. WAUGH, *J. Am. Chem. Soc.*, 84 (1962) 4938.
- ¹⁶ J. GARNIER, *Biochim. Biophys. Acta*, 66 (1963) 366.
- ¹⁷ R. G. WAKE ET R. L. BALDWIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 47 (1961) 225.
- ¹⁸ HS. NITSCHMANN, *Helv. Chim. Acta*, 32 (1949) 1258.

enzyme-substrat lui-même puisque nous avons observé la même inhibition en ajoutant simultanément la présure et la caséine α_s à la caséine κ .

La chaleur de formation, ΔH , du complexe caséine κ -caséine α_s étant nulle, toute la variation d'énergie libre, $\Delta F = -RT \log_e 1/K_{\alpha_s} = -6350 \pm 150$ cal/mole, est liée à une variation positive d'entropie $\Delta S = +21 \pm 0.5$ cal/degré/mole. La formation du complexe caséine κ -caséine α_s est donc accompagnée d'un remaniement intramoléculaire important.

L'inhibition apparente qui résulte de la formation du complexe caséine κ -caséine α_s est complète pour des concentrations en caséine α_s relativement faibles si on les compare à celles utilisées par WAUGH pour cette même étude. Le chiffre de trois molécules de caséine α_s trouvé par cet auteur doit plutôt correspondre au nombre maximum de molécules de caséine α_s que la caséine κ est susceptible de fixer. On conçoit qu'il suffise de la présence d'une seule molécule de caséine α_s pour entraîner la rétrogradation de la dissociation du carboxyle; la fixation de deux autres molécules n'y ajoutera rien et ne se marquera pas par une nouvelle diminution du nombre de protons libérés. On peut en déduire également que la constante d'association de la caséine κ avec cette première molécule de caséine α_s est beaucoup plus élevée que celle des deux autres.

On peut envisager une action à distance par un changement de structure de la caséine κ (effet d'allostérie) ou encore concevoir que la caséine α_s se fixe en un point proche du site d'attaque de l'enzyme, plaçant par exemple à proximité du carboxyle une charge positive qui l'empêcherait de se dissocier. Cependant ce site de fixation de la caséine α_s doit être différent de celui de l'enzyme, sinon on observerait une inhibition de la réaction enzymatique elle-même. Cette association a pour résultat de faire rétrograder complètement à pH 7 la dissociation du groupe carboxylique. Comme la précipitation de la caséine κ est également inhibée, il est possible d'assigner à ce groupe un rôle dans la formation des fibrilles de la paracaséine κ .

Ainsi trouvons-nous une interaction remarquable entre deux protéines isolées de la caséine entière, interaction comparable à celle observée lors de la formation d'un complexe enzyme-substrat mais sans qu'il en résulte une activité catalytique. La réaction est réversible et entraîne pour le complexe une propriété nouvelle, celle de former avec le calcium des hauts polymères, ou micelles, de poids moléculaire compris entre 10^7 et $3 \cdot 10^9$ (voir réf. 18), en équilibre d'après WAUGH⁶ avec de petits polymères. Leur grande stabilité est unique parmi les suspensions micellaires connues et représente d'ailleurs une des principales propriétés mises à profit dans l'utilisation du lait par l'homme.

RESUME

L'addition de caséine α_s à la caséine κ entraîne au cours de l'action de la présure:

1. Une diminution du nombre de protons libérés déterminé par la méthode potentiométrique à pH 6.9.

2. Une inhibition de la formation des fibrilles par la paracaséine κ .

Ceci peut s'expliquer par une association réversible entre la caséine α_s et la caséine κ dans un rapport molaire égal à 1 en un point proche du site d'attaque de la présure mais différent du site de fixation de l'enzyme.

Cette association a pour conséquence la rétrogradation de la dissociation à

strains have produced yields of 17–20 tons of roots per acre.

A detailed study of the changes occurring in canaigre growth and chemical constitution showed a steady and rapid increase in the tannin content and extract purity throughout the growing season. The best harvest time for canaigre *grown near Mesa, Arizona*, would be late June to August.

High-tannin, high-purity strains of canaigre are being preserved in a living germ plasm bank. This preservation and the knowledge resulting from canaigre research would make possible the large-scale growing of canaigre roots of high-tannin content and the commercial production and use of canaigre extract of high purity.

ACKNOWLEDGMENT

The authors acknowledge with thanks the assistance of Mrs. M. F. Fisher with the tannin analyses involved in this research.

REFERENCES

1. Trimble, H. *The Tannins*, Vol II, 105 (1894).
2. Rogers, J. S., and Russell, G. A. *JALCA*, 39, 467 (1944).
3. Russell, G. A., Rogers, J. S., and Stevenson, E. C. *JALCA*, 39, 479 (1944).
4. Gilbert, N. W., and Black, D. S. *Canaigre, A Potential Domestic Source of Tannin*, U. S. Dept. of Agriculture, Production Research Report No. 28, April, 1959.
5. Luvisi, F. P., and Rogers, J. S. *JALCA*, 43, 166 (1948).
6. Griffin, E. L., Jr., Turkot, V. A., and Roger, N. F. *JALCA*, 52, 176 (1957).
7. Cordon, T. C., Beebe, C. W., and Rogers, J. S. *JALCA*, 42, 118 (1947).
8. *Idem*. 128.
9. Luvisi, F. P., Cordon, T. C., Beebe, C. W., and Rogers, J. S. *JALCA*, 44, 707 (1949).
10. Beebe, C. W., Cordon, T. C., and Rogers, J. S. *JALCA*, 41, 161 (1946).
11. Cordon, T. C. *JALCA*, 45, 485 (1950).
12. Rieder, R. M., Roger, N. F., Phillips, G. W. M., and Eskew, R. *JALCA*, 46, 188 (1951).
13. ———, Turkot, V. A., Eskew, R. K., and Phillips, G. W. M. *JALCA*, 46, 264 (1951).
14. Cordon, T. C., and Everett, A. L. *JALCA*, 49, 43 (1954).
15. Griffin, E. L., Jr., Roger, N. F., Redfield, C. S., Claffey, J. B., and Eskew, R. K. U. S. Agricultural Research Service, ARS 73-22, March, 1959.
16. Beebe, C. W., Kip, W. S., II, and Rogers, J. S. *JALCA*, 46, 197 (1951).
17. ———, ———, Happich, W. F., and Rogers, J. S. *JALCA*, 49, 228 (1954).
18. Seligsberger, L., Mann, C. W., and Naghski, J. *A Field Test of Canaigre-tanned Heavy Leather in Low-Quarter Shoes*, U. S. Quartermaster Research and Engineering Command, Footwear and Leather Series Report No. 15, October, 1959.
19. Official Methods of Analysis, ALCA, 1957. May be secured from Secretary of ALCA, Dept. of Leather Research, University of Cincinnati 21, Ohio.

Received December 27, 1963.

A method was needed for maintaining selected root stock over an indefinite period in protected locations with no maintenance cost. Such a method was set up by Crops Research Division in a germ plasm bank.

Canaigre is able to survive in the wild for a number of years when rainfall is insufficient to produce any top growth. It is not usually molested by animals in the wild; and, although insects do infest it, they do not destroy the plants. Humans rarely dig it for any purpose, but the plant does not survive long in areas where human activities such as cultivation, intensive recreational use, gravel pit operations, etc., disturb it. National Forest lands, from which most of these activities are excluded, seemed to offer the best location for preserving canaigre samples. Tonto National Forest, a few miles from Mesa, Arizona, with areas of elevation only slightly higher than Mesa, offered the best promise of a planting area. Canaigre had also been found growing wild at numerous places along streams and dry washes in that area. This demonstrates that the climate, soil, and biological factors involved are favorable for canaigre growth.

If the efforts of the breeding programs are to be preserved, it is imperative that root stocks of all existing nursery material of value be included in such a germ plasm bank planting. Experience had shown it to be desirable to make the plantings in triplicate, i.e., three separate locations. This would increase the chances of survival of each entry and insure against loss of the entire collection of material due to an accident at one or even two of the locations. It is also desirable that plantings be made of a considerable quantity of each of a number of the best vegetative lines developed thus far and increased under cultivation. In case of a revival of interest in canaigre at some future date, such bulk plantings could save several years of time in developing a canaigre production program.

Plans for discontinuing the canaigre projects were announced in 1961. Breeding work was terminated prior to the 1961 harvest. During 1961 and 1962, 217 hills, representing 212 lines of stock, were planted in three selected wild locations in Tonto National Forest. These were called nursery plantings. For information on each of these 212 varieties, see Footnote 2 in the abstract. However, all but seven of these varieties have a tannin content above 30%. Most contain over 35% tannin, with 17 containing more than 40% tannin. The purity of only 8 varieties was below 60%. Most of the varieties have a purity over 65%, with 49 being above 70%.

In addition, four high-tannin, high-yielding canaigre varieties — SR 28, SR 41, A 25-135, and (SRXY)-7 — were planted in quantity at each site. A description is found in Table VI.

Plantings at the three sites were inspected in 1963. Good survival was found on most nursery material, and excellent stands were found in the bulk plantings.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

A large number of canaigre strains containing 37–40% tannin have been produced. The extract purity of these strains ranges from 65–74%, and several